

PC12 細胞を用いた食品成分の神経保護作用評価

瀬戸山 央 (化学技術部環境安全・バイオグループ)

1. はじめに

近年、平均寿命の延伸、高齢化に伴い認知症をはじめとする神経疾患の発症が増加している。神経疾患発症後の治療は困難であり、完治を目指すよりも進行抑制や症状緩和が主となるため、神経疾患発症前に防ぐことが重要である。その方法の一つとして日常の食品摂取による神経保護があるが、食品の神経保護作用については動物を用いた脳機能を中心として評価されており費用と時間を要する。そのため簡便な食品の神経保護作用評価方法の構築が望まれている。

本研究は、食品成分の神経保護作用について、神経のモデル細胞であるラット褐色細胞腫 PC12 細胞を用いて簡便に評価できる評価系の構築を目的とした。本稿では主に生存率と活性酸素 (ROS) 生成量に着目して 2 つの食品成分 (クロロゲン酸, シアニジン-3-ルチノシド) の評価を行ったので報告する。これにより、神経保護作用をもつ新たな食品や機能性成分の迅速なスクリーニングが低コストで可能となり、新規機能性食品の開発を促進することができる。

2. 実験

2.1 材料

ラット褐色細胞腫 PC12 細胞 (JCRB0733) は、JCRB 細胞バンク (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所) から分譲されたものを用いた。シアニジン-3-ルチノシドは長良サイエンス株式会社、Cell Counting Kit-8、ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA は株式会社同仁化学研究所、その他の試薬は富士フィルム和光純薬株式会社のものを用いた。

2.2 PC12 細胞への酸化ストレス誘導条件の検討

PC12 細胞は RPMI1640 培地 (10% horse serum, 5% fetal bovine serum を含む) を用いて培養を行った。培養は CO₂ インキュベーター (MCO-170AIC-PJ, PHC ホールディングス株式会社) を用い、37°C、CO₂ 濃度 5% の条件で行った。PC12 細胞は 1.0×10^4 cells/well となるように 96well マイクロプレート (Collagen TypeI coated Multiwell Plate 96well, AGC テクノグラス株式会社) に播種し、24h 前培養を行った。酸化ストレスを誘導するため、H₂O₂ (終濃度 0, 50, 100, 200, 300 μ M) を加え、2h および 4h 処理後に Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存率の測定を行った。独立した 3 回の試験を行い、結果は平均値±標準偏差として表示した。

2.3 酸化ストレス誘導 PC12 に対する食品成分の神経保護作用評価

PC12 細胞を 1.0×10^4 cells/well となるように 96well マイクロプレート (Collagen TypeI coated Multiwell Plate 96well, AGC テクノグラス株式会社) に播種し、24h 前培養を行った。その後、クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) を終濃度 5, 10 μ M となるように加え 24h 培養を行った。その後、酸化ストレス誘導のため H₂O₂ (終濃度 300 μ M) を加え 2h 培養後、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存率の測定を行った。

PC12 細胞を 1.0×10^4 cells/well となるように 96well マイクロプレート (CELLCOAT, Collagen, μ Clear, 96well, 株式会社グライナー・ジャパン) に播種し、24h 前培養を行った。その後、クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) を終濃度 5, 10 μ M となるように加え 24h 培養を行った。その後、酸化ストレス誘導のため H₂O₂ (終濃度 300 μ M) を加え 2h 処理後、ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA を用いて、活性酸素 (ROS 生成量) の測定を行った。測定条件は、マルチモードマイクロプレートリーダー (Infinite[®] 200 PRO, Tecan) にて励起波長 490 nm, 蛍光波長 530 nm とした。すべての試験は独立して 3 回行い、結果は平均値±標準偏差として表示した。

3. 考察及び今後の展開

PC12 細胞への酸化ストレス誘導条件を決定するため、H₂O₂ (終濃度 0, 50, 100, 200, 300 μ M) を加え、2h および 4h 培養を行った。生存率の結果を図 1 に示す。H₂O₂ を加えない場合を生存率 100% とした場合、H₂O₂ 濃度依存的に生存率は低下する傾向が見られた。また、生存率は H₂O₂ 終濃度 200 μ M までは 2h と 4h でほぼ差が見られなかったが、300 μ M では 2h よりも 4h で顕著に生存率の低下が認められた。

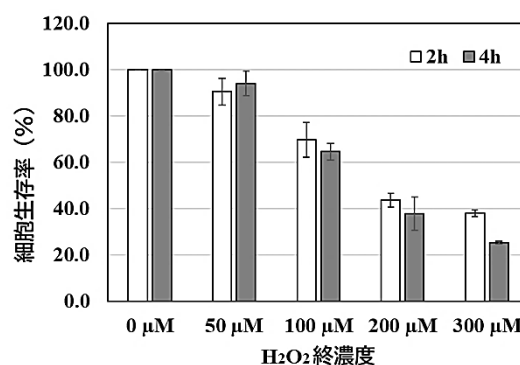


図 1 H₂O₂ 処理による PC12 細胞の生存率

そこで、PC12 細胞への酸化ストレス誘導条件は H₂O₂ 終濃度 300 μM、処理時間 2h に決定した。

本研究では、我々が日常的食事などから摂取する食品成分のうち、コーヒーに多く含まれているポリフェノール類であるクロロゲン酸¹⁾および果実ベリー類に多く含まれているアントシアニン類であるシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R)²⁾に着目し、これらの神経保護作用を明らかにするため、酸化ストレス誘導した PC12 細胞の生存率を指標として評価を行った。クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) を 24h 細胞に処理した後、H₂O₂ (終濃度 300 μM、処理時間 2h) により酸化ストレス誘導した際の生存率を図 2、図 3 に示す。

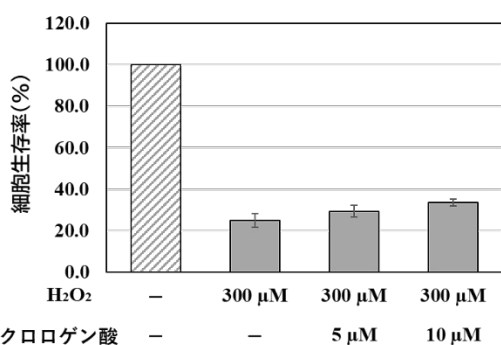


図 2 クロロゲン酸処理による酸化ストレス保護作用

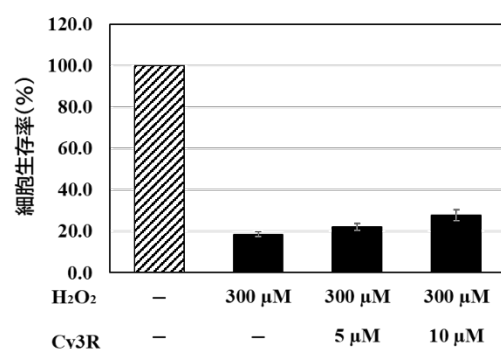


図 3 シアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) 処理による酸化ストレス保護作用

PC12 細胞に対し H₂O₂ にて酸化ストレス誘導を行うと生存率は約 20% となり著しく低下した。一方、クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) を酸化ストレス誘導の前に処理した場合、どちらも濃度依存的に生存率の上昇が認められた。このことから、クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) が H₂O₂ による酸化ストレスに対して細胞保護作用を示すことが示唆された。

H₂O₂ による酸化ストレス誘導では細胞内に活性酸素 (ROS) が生成し、生存率の低下の要因となる。そこで活性酸素 (ROS) 生成量の測定を行った。その結果を図 4 および図 5 に示す。

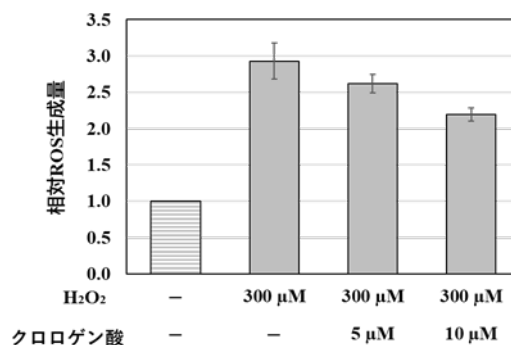


図 4 クロロゲン酸処理による ROS 生成量への影響

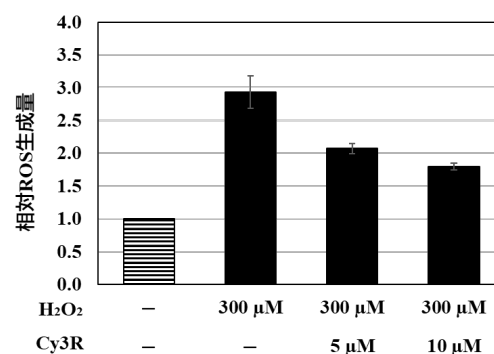


図 5 シアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) 処理による ROS 生成量への影響

PC12 細胞に対し H₂O₂ にて酸化ストレス誘導を行うと ROS 生成量は約 3 倍となった。一方、クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) を酸化ストレス誘導の前に処理した場合、どちらも濃度依存的に ROS 生成量を抑制することが認められた。このことから、クロロゲン酸およびシアニジン-3-ルチノシド (Cy3R) が H₂O₂ によって生じる細胞内 ROS の生成量を抑制し、細胞生存率を上昇させ、細胞保護作用を示すことが示唆された。

以上のように PC12 細胞を用いて細胞生存率と ROS 生成量を指標として測定することで、食品成分の神経保護作用評価を迅速に行うことが可能となる。今後、本研究の手法を用いて様々な食品素材、成分に対して評価を行うことを考えている。

【参考文献】

- 河野洋一; 藤田和弘. コーヒー豆中のクロロゲン酸類と総ポリフェノールの分析. *分析化学*, 65.6, 331-334 (2016).
- Antognoni F, Potente G, Mandrioli R, Angeloni C, Freschi M, Malaguti M, Hrelia S, Lugli S, Gennari F, Muzzi E, et al., *Antioxidants*, 9(8), 677 (2020).

【外部発表】 論文発表 1 件